

①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①⑫ Offenlegungsschrift
①① DE 31 19 269 A 1

⑤① Int. Cl. 3:
C 12 Q 1/00
G 01 N 33/48

②① Aktenzeichen:
②② Anmeldetag:
④③ Offenlegungstag:

P 31 19 269.6
14. 5. 81
2. 12. 82

⑦① Anmelder:
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften e.V., 3400 Göttingen, DE

⑦② Erfinder:
Emmrich, Frank, Dr., 7803 Gundelfingen, DE

DE 31 19 269 A 1

⑤④ Verfahren zur Bestimmung der zellvermittelten Reaktivität

Zur Bestimmung der zellvermittelten Reaktivität durch Behandlung von Lymphozyten in Gegenwart migrationsfähiger Zellen mit einer, die Zellreaktivität beeinflussenden Substanz, bringt man eine Mischung von migrationsfähigen Zellen und Lymphozyten in ein auf einer Trägerplatte aufgebrachtes Gel ein, beschichtet die dem Gel zugekehrte Oberfläche der Trägerplatte mit der die Zellreaktivität beeinflussenden Testsubstanz und mißt die Zellmigrationshöfe, die sich auf der Trägerplatte bilden.
(31 19 269)

DE 31 19 269 A 1

PATENTANWÄLTE

3119269
DIPL.-ING. H. WILCKMANN, DIPL.-PHYS. DR. K. FINCKE
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN, DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR. ING. H. LISKA

HHu

8000 MÜNCHEN 86, DEN 14 Mai 1981
POSTFACH 860820
MÜHLSTRASSE 22, RUFNUMMER 98 39 21/22

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.
Bunsenstraße 10
D-3400 Göttingen

Verfahren zur Bestimmung der zellvermittelten Reaktivität

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Bestimmung der zellvermittelten Reaktivität durch Behandlung von Lymphozyten in Gegenwart migrationsfähiger Zellen mit einer, die Zellreaktivität beeinflussenden Substanz, Einbringen der behandelten Zellen in ein auf einer Trägerplatte aufgebrachtes Gel und Ausmessung der Zellmigrationshöfe, die sich auf der Trägerplatte bilden, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man die dem Gel zugekehrte Oberfläche der Trägerplatte mit der die Zellreaktivität beeinflussenden Substanz vorbeschichtet und eine Mischung von migrationsfähigen Zellen und Lymphozyten direkt in das Gel einführt.

140501

2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß man eine Träger-
platte aus Kunststoff oder Glas verwendet.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man die Mischung aus migrationsfähigen Zellen und
Lymphozyten in Löcher einer auf der Trägerplatte be-
findlichen, Zellkulturmedium enthaltenden Gelschicht
einbringt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man die Mischung aus migrationsfähigen Zellen und
Lymphozyten in flüssiges Gel einbringt, danach letzteres
in kleinen Portionen auf die Trägerplatte tropft, er-
starren läßt und mit weiterem Zellkulturmedium enthalten-
den Gel überschichtet.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß
man ein Agarosegel verwendet.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß
man als die Zellreaktivität beeinflussende Substanz eine
Komponente der Bindungsreaktion zwischen einem spezifisch
bindefähigen Protein und einer damit bindefähigen Substanz
verwendet.
7. Verfahren nach Anspruch 6, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß man als Komponente
der Bindungsreaktion zwischen einem spezifisch bindefähigen
Protein und einer damit bindefähigen Substanz ein
Antigen oder ein Hapten zusammen mit einem Protein ver-
wendet.

14.05.81
- 3. -

3119269

8. Verfahren nach Anspruch 7, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß man Hapten und
Protein gleichzeitig oder abwechselnd beschichtet.
9. Vorrichtung durch Durchführung des Verfahrens nach An-
spruch 1 bis 8, gekennzeichnet durch eine Gelträger-
platte (1), welche auf der dem Gel zugekehrten Oberfläche
eine Schicht (2) aufweist, die aus einer, die Zellreakti-
vität beeinflussenden Substanz besteht oder diese enthält.
10. Vorrichtung nach Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß die Gelträger-
platte durchsichtig ist.
11. Vorrichtung nach Anspruch 9 oder 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß mehrere Gel-
trägerplatten (1) mit gleichen oder verschiedenen, die
Zellreaktivität beeinflussenden Substanzen in Schicht (2)
auf einer Unterlage (3) zusammengefaßt sind.

PATENTANWÄLTE

DIPL.-ING. H. WEICKMANN; DIPL.-PHYS. DR. K. FINCKE
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN; DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR. ING. H. LISKA 4.

3119269

HRu

Max-Planck-Gesellschaft
zur Förderung der Wissenschaften e.V.

8000 MÜNCHEN 86, DEN

POSTFACH 860820

MÜHLSTRASSE 22, RUFNUMMER 98 39 21/22

Verfahren zur Bestimmung der zellvermittelten Reaktivität

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der zellvermittelten Reaktivität durch Messung der Migrationshemmung migrationsfähiger Zellen, welche durch Lymphozyten bei Kontakt mit einer die Zellreaktivität beeinflussenden Substanz, mit der sie reaktionsfähig sind, hervorgerufen wird. Die Erfindung eignet sich besonders für immunologisch wirksame, die Zellreaktivität beeinflussende Substanzen, wie z. B. Antigene, und wird daher im folgenden anhand dieser Ausführungsform beschrieben.

Lymphozyten setzen nach erneutem Kontakt mit Antigen, gegen welches sie sensibilisiert sind, verschiedene lösliche Faktoren frei, von denen einige in der Lage sind, die Wanderung (Migration) anderer Zellen (z. B. Granulozyten, Monozyten, Makrophagen) zu beeinflussen. Diese anderen Zellen, im folgenden als migrationsfähige Zellen bezeichnet, können daher als Indikatorsystem dienen und zeigen im allgemeinen durch eine Migrationshemmung an, daß die untersuchten

14.05.61
5.

3119269

Lymphozyten im Sinne der zellvermittelten Immunreaktivität (cell-mediated immunity (CMI)), sensibilisiert sind. Bei einem bekannten Verfahren wird dies im sogenannten Leukozyten-Migrationstest ausgenützt.

Mit Hilfe der Leukozyten-Migrations-Hemmtests kann die Sensibilisierung sowohl gegenüber partikulären Antigenen (Bakterien, Viren, Pilzen, Tumorzellen, Transplantat-spenderzellen) als auch gegenüber löslichen Antigenen (Proteine, niedermolekulare Verbindungen mit Proteinbin-dung) festgestellt werden, soweit sie eine zellvermittelte Immunreaktion auslösen.

Von mehreren Seiten wurde unter Einsatz von Tumorgewebs-extrakten eine möglicherweise diagnostisch nutzbare Reaktion bei Tumorträgern festgestellt. Tumorträger wurden mit 70 bis 90 %iger Wahrscheinlichkeit ermittelt und durch das Reaktionsmuster gegen verschiedene parallel getestete Gewebspräparationen ergaben sich Hinweise auf die Organ-lokalisation des Tumors. Neben der Tumordiagnostik und -verlaufskontrolle mit Hilfe der Leukozyten-Migrations-Technik wurden weitere Krankheiten untersucht, bei denen zelluläre Sensibilisierungen möglicherweise beteiligt sind. Als Beispiele seien genannt:

Bakterielle Erkrankungen (Tuberkulinsensibilisierung), Mykosen, neurologische Erkrankungen, entzündliche Knochen-erkrankungen, Coeliakie, drogeninduzierte Hepatitis, Toxoplasmose und Arzneimittelallergie Typ IV.

Zur Durchführung der Bestimmung im direkten Testansatz wird z. B. mit einer grob getrennten Suspension aller weißen Blutzellen der Testperson gearbeitet, die (im positiven Fall sensibilisierte) Lymphozyten (Faktorfreisetzung) und Granulozyten als Indikatorzellen (im allgemeinen Migrations-hemmung) enthält.

Dieses Prinzip der Leukozytenmigrationshemmung zur Testung der zellvermittelten Immunreaktivität beim Menschen wird gemäß Acta med. scand 181 (1967), 247-256 in die Kapillartechnik übertragen. Hierbei werden die Zellen in kleinen Glaskapillaren zentrifugiert, das Ende der Kapillare mit dem Zellsediment abgeschnitten und auf dem Boden einer Kammer derart plaziert, daß die Zellen in unregelmäßiger Pilzform auf dem Boden auswandern. Die Kammer ist mit Zellkulturmedium gefüllt, in dem sich beim Testansatz das gelöste Antigen befindet. Die Migrationshöfe werden vermessen, z. B. durch Planimetrie, und als Testergebnis ein Quotient aus der Fläche der ausgewanderten Zellen ohne bzw. mit Antigenzusatz gebildet. Nachteile dieses Verfahrens ergeben sich durch die aufwendige und nicht standardisierbare Vorbereitung der Kapillaren und die unregelmäßige und nicht berechenbare Form der Migrationshöfe.

Um diese Nachteile zu beseitigen, wurde der sogenannte "Leukozyten-Migrations-Test unter Agarose" (LMTA) entwickelt (Acta Allergol. 26 (1971), 56-80), auf den die im folgenden beschriebene Erfindung näher Bezug nimmt.

Bei der LMTA-Methode werden die Zellen zunächst mit dem Antigen kurze Zeit inkubiert und dann in Löcher eingefüllt, die in einer erstarrten Agaroseschicht ausgestanzt werden. Die Agaroseschicht wurde zuvor unter Zusatz von Zellkulturmedium hergestellt. Aus den Löchern wandern die Zellen zwischen Agaroseschicht und Unterlage aus und bilden regelmäßig kreisförmige Höfe. Das Ergebnis wird, wie beschrieben, als Quotient von Kontroll- und Testansatz ermittelt.

Gegenüber der Kapillartechnik erlaubt die LMTA-Methode eine größere Anzahl von Ansätzen und liefert regulär kreisförmige Migrationshöfe sowie schärfere Randzonen, die besser auszumessen sind. Sie konnte jedoch nicht alle Nachteile der Kapillartechnik beseitigen und hat selbst

- 4/7

3119269

neue Probleme aufgeworfen, nämlich

- Bei der Serientestung von unterschiedlichen Zellen-suspensionen in großer Anzahl spielt der Zeitfaktor bei der Vorbereitung der Einzelansätze eine wesentliche Rolle, so daß die Vorinkubation mit Antigen in der LMTA-Methode sehr ungünstig ins Gewicht fällt (1 h Vorinkubationszeit, mit Umfüllen der Proben 1/2 - 2 h).
- Hinzu kommt der zusätzliche Verbrauch von Einwegmaterial (Pipetten, Reagenzgläser), sowie
- Zellverluste durch mehrfaches Umfüllen und daneben
- mögliche Alteration der Zellen.
- Nach wie vor geht Zeit für die Vorbereitung und das Einfüllen der Antigengebrauchsverdünnungen verloren, die im Test eingesetzt werden sollen, zusätzlich entstehen Fehlerquellen.

Diese Nachteile stehen der industriellen Fertigung und Verbreitung eines Testbesteckes auf der Grundlage des LMTA entgegen.

Analog liegen die Verhältnisse bei anderen, die Zellreaktivität beeinflussenden Substanzen.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, die aufgezeigten Nachteile, insbesondere des LMTA, zu überwinden. Zur Lösung dieser Aufgabe wurde die zu testende Substanz direkt an die Migrationsfläche gekoppelt und die Probe migrationsfähiger Zellen unmittelbar auf die vorbehandelte Fläche aufgebracht.

11.05.81
-5/-
8.

3119269

Danach ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung der zellvermittelten Immunreaktivität durch Behandlung von Lymphozyten in Gegenwart migrationsfähiger Zellen mit einer, die Zellreaktivität beeinflussenden Substanz, Einbringen der behandelten Zellen in ein auf einer Trägerplatte aufgebrachtes Gel und Ausmessung der Zellmigrationshöfe, die sich auf der Trägerplatte bilden, dadurch gekennzeichnet, daß man die dem Gel zugekehrte Oberfläche der Trägerplatte mit der die Zellreaktivität beeinflussenden Substanz vorbeschichtet und eine Mischung von migrationsfähigen Zellen und Lymphozyten direkt in das Gel einführt (droplet-Test) oder in Stanzlöcher einbringt. Als die Zellreaktivität beeinflussende Substanz wird bevorzugt eine Komponente der Bindungsreaktion zwischen einem spezifisch bindefähigen Protein und einer damit bindefähigen Substanz, insbesondere ein Antigen, eingesetzt.

Als Antigen können im erfindungsgemäßen Verfahren sowohl die oben erwähnten partikulären als auch die löslichen Antigene einschließlich der Haptene verwendet werden, die erst nach Bindung an eine Trägersubstanz mit antigener Wirksamkeit, insbesondere an Protein, eine Immunantwort hervorrufen können.

Die Beschichtung der Trägerplatte erfolgt, ggf. nach einer aktivierenden Vorbehandlung, entweder rein adsorptiv, durch chemische Fixierung nach üblichen Methoden, durch physikalische Vorbehandlung oder chemische Bindung nach den dem Fachmann bekannten Methoden der Trägerfixierung. Derartige Methoden sind dem Fachmann geläufig und brauchen hier nicht näher beschrieben zu werden.

Die Oberfläche der Trägerplatte, welche die Migrationsfläche darstellt, kann aus den üblichen Kunststoffmaterialien, wie sie im allgemeinen für Gewebe- und Zell-

11.05.51
9.

3119269

kulturen verwendet werden, aber auch aus Glas, und ähnlichen Materialien bestehen. Bevorzugt werden durchsichtige Materialien, da sie in manchen Fällen eine erleichterte Auswertung der Migrationshöfe zulassen. Die Migrationsoberflächen werden normalerweise einfach mit der zu testenden Substanz, zweckmäßig in wässriger Lösung, übergossen, einige Zeit einwirken gelassen und danach mehrfach gespült. Beispielsweise werden übliche Petrischalen mit einer Lösung eines Antigens in solcher Menge beschickt, daß die Oberfläche bedeckt ist, einige Zeit stehengelassen und schließlich ausgeleert und nachgewaschen.

Als Gel wird vorzugsweise Agarosegel verwendet, jedoch können auch andere ähnliche Eigenschaften aufweisende organische Gele verwendet werden. Die Gelschicht wird hergestellt, indem man beispielsweise Agarose in destilliertem Wasser durch Erhitzen im Wasserbad löst. Je nach Fabrikat sind dabei Endkonzentrationen zwischen etwa 0,75 und etwa 1,0 % zweckmäßig. Nach Abkühlen auf etwa 48 °C wird mit Zellkulturmedium, zweckmäßig doppelt konzentriertem Zellkulturmedium, und inaktiviertem Serum versetzt. Eine Endkonzentration um 10 % hat sich bewährt. Zellkulturmedien mit speziellen Zusätzen, die eine hinreichende Migration bewirken, z. B. Gemisch von Albuminen, Lecithin bedürfen keines Serumzusatzes.

Gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung, die vom oben erwähnten LMTA-Prinzip ausgeht, wird die noch warme Agaroselösung auf die vorbereiteten, z. B. mit Antigen beschichteten Trägerplatte verteilt und erstarren gelassen. Dann werden Löcher ausgestanzt, wobei sich ein Durchmesser von 1,5 bis 2 mm als besonders zweckmäßig herausgestellt hat, obwohl auch größere und kleinere Durchmesser angewendet werden können. Falls die so vorbereiteten Platten längere Zeit aufbewahrt werden sollen, erfolgt dies zweckmäßig unter Luftabschluß und ggf. unter Verwendung von inerten Ölen zur Versiegelung.

11-05-81

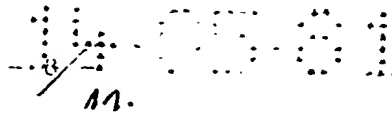
3119269

10.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird Blut mit einem Antikoagulans, wie Heparin, und zweckmäßig auch einem üblichen Sedimentationsbeschleuniger versetzt und inkubiert, bis der leukozytenhaltige bernsteinfarbene Überstand klar abgegrenzt ist. Bei einer Inkubationstemperatur von 37 C ist hierfür im allgemeinen etwa eine Stunde erforderlich.

Der Überstand wird abgetrennt, zentrifugiert, die Zellen werden gewaschen, ausgezählt und auf die gewünschte Packungsdichte eingestellt. Zweckmäßig sind etwa $0,5$ bis 4×10^5 weiße Zellen/ μ l, empfohlen werden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro μ l. Günstigerweise werden jeweils 3 bis 4 Parallelansätze vorgesehen. Eine etwaige Erythrozytenkontamination wird durch Lyse beseitigt, beispielsweise mit destilliertem Wasser. Die erhaltene Zellsuspension wird dann in die Stanzlöcher der Gelplatten gleichmäßig verteilt und bei 37 C inkubiert. Die Auswertung kann zwischen 4 Stunden und 24 Stunden nach Beginn der Inkubation erfolgen. Nach mehr als 24 Stunden tritt keine nennenswerte zusätzliche Migration mehr auf. Besonders leicht auswertbare Ergebnisse werden bei 15 bis 20 stündiger, vorzugsweise 18 stündiger Inkubationsdauer erhalten.

Zur Auswertung werden die gebildeten Migrationsflächen vermessen. Da sie normalerweise eine regelmäßige Kreisform aufweisen genügt es, lediglich den Durchmesser der Migrationshöfe zu bestimmen. Schließlich bildet man den Quotienten, den sogenannten Migrationsindex (MI) aus der mittleren Fläche bzw. dem mittleren Durchmesser der Migrationshöfe mit und ohne Antigen bzw. zu testender Substanz. Zweckmäßig werden die zu messenden Höfe durch Projektion vergrößert. Die Höfe können mit geeigneten optischen Verfahren nativ oder nach vorheriger Fixierung nach den in der Histologie üblichen Fixierungsmethoden, vermessen werden. Werden die Migrationshöfe fixiert, so kann die Gelschicht, auf deren Unterseite sich die Migrationshöfe befinden, vor der Messung von der



3119269

Trägerplatte abgehoben werden. Günstig ist für die Auswertung der Einsatz eines programmgesteuerten Rechners.

Die Durchführung des Verfahrens unter sterilen Bedingungen ist günstig, die Anforderungen an Sterilität sind wegen der kurzen Testdauer jedoch nicht hoch.

Diese Ausführungsform der Erfindung entwickelt den bekannten LMTA-Test durch Zusammenfassung von Testsubstanzpräsentation und Zellmigration zu einem Einstufenverfahren weiter, welches als "solid-phase LMTA" bezeichnet werden kann. Die Vorteile gegenüber dem bekannten LMTA sind wesentliche Zeitersparnis, Ersparnis an Einwegmaterial, Vermeidung von Zellverlusten und damit Einsparung an Patientenblut, Einsparung von Vorbereitungsarbeiten wie Lösen, Einfüllen, Verdünnen der Testsubstanz, minimale Alteration der Zellen, die unmittelbar ihrem endgültigen Einsatzort zugeführt werden, verringerter Bedarf an Testsubstanz durch Rückgewinnung des überschüssigen, nicht an die Migrationsoberfläche gekoppelten Anteils sowie besondere Eignung zur Herstellung von Testbestecken, da die vom Anwender auszuführenden Arbeitsschritte weitgehend verringert werden und Fehler bei der Zubereitung entfallen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann diese auch auf dem Prinzip des sogenannten Leukozyten-Migrations-Tröpfchentests (LMDT;) durchgeführt werden. Beim bekannten LMDT-Test werden die mit einem Antigen vorinkubierten weißen Zellen in kleinen Agarose-tröpfchen auf Oberflächen aufgetropft und erstarren dort. Nach Überschichtung der kleinen Tröpfchen mit Zellkulturmedium können die Zellen aus den Tröpfchen auf der Trägeroberfläche auswandern. Erfindungsgemäß wird anstelle einer Vorinkubation der weißen Zellen mit Antigen wieder eine antigenbeschichtete Trägeroberfläche verwendet. Die weißen Zellen werden dann direkt in Weichagarose verteilt, auf die mit Antigen beschichtete Oberfläche in Form kleiner Tröpfchen aufgebracht, erstarren gelassen und mit Zellkulturmedium überschichtet. Diese Ausführungsform der Erfindung

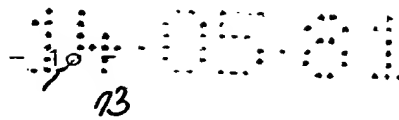
14.05.81
- 8 -
12.

3119269

kann als solid-phase LMDT bezeichnet werden. Die übrigen Bedingungen sind die gleichen wie oben beim solid-phase LMTA beschrieben. Das Verfahren ist, wie oben erläutert, nicht nur für Antigene oder andere immunologisch reaktive Substanzen, z. B. Antikörper, sondern ganz allgemein für die Zellreaktivität beeinflussende Substanzen (Testsubstanzen) anwendbar. Beispiele hierfür sind Inhibitoren von Zellmembranenzymen, Pharmaka bzw. andere Testsubstanzen, durch welche die Zellmigration durch ein nicht immunologisches Wirkungsprinzip beeinflusst wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Sie ist gekennzeichnet durch eine Gelträgerplatte (1), welche auf der dem Gel zugekehrten Oberfläche eine Schicht (2) aufweist, die aus einer die Zellreaktivität beeinflussenden Substanz besteht oder dieses enthält. Vorzugsweise besteht die Gelträgerplatte aus durchsichtigem Material, um eine Ausmessung und ggf. Projektion der Migrationshöfe ohne Fixierung und Abnahme der Gelschicht zu gestatten.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform dieser Vorrichtung sind mehrere Gelträgerplatten (1), die gleiche oder verschiedene die Zellreaktivität beeinflussenden Substanzen in Schicht (2) tragen, auf einer gemeinsamen Unterlage (3) zusammengefaßt. Diese gemeinsame Unterlage kann beispielsweise aus einer schachtelartig oder in anderer Weise geformten Platte mit vorgeformten Vertiefungen bestehen, in welche die einzelnen Gelträgerplatten (1) eingelagt sind. Die Unterlage (3) mit den Gelträgerplatten (1) kann dann mit dem Gel überschichtet werden. Die Schicht (2) auf der Gelträgerplatte (1) kann die dem Gel zugekehrte Oberfläche ganz oder teilweise bedecken. Bei teilweiser Bedeckung, die beispielsweise nur eine Hälfte der Oberfläche umfaßt, kann auf dem keine Schicht (2) tragenden Teil der Gelträgerplatte der Kontrollansatz durchgeführt werden.



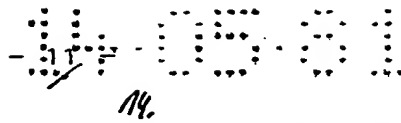
3119269

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter in Verbindung mit der beigegeführten Zeichnung. In dieser stellen dar:

- Fig. 1 eine grafische Darstellung der absoluten Flächen von Migrationshöfen in Form von Säulendiagrammen, die nach dem Verfahren von Beispiel 1 erhalten wurden.
- Fig. 2 eine grafische Darstellung der Migrationsindizes menschlicher Leukozyten bei dem im Beispiel 2 beschriebenen Verfahren.
- Fig. 3 eine Zeichnung einer erfindungsgemäßen Gelträgerplatte (1) mit der antigenhaltigen Schicht (2) im Schnitt.
- Fig. 4 eine schematische Darstellung der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer Mehrzahl von Gelträgerplatten (1), die auf einer gemeinsamen, schachtelbodenartigen Unterlage (3) zusammengefaßt sind.

In Fig. 1 sind auf der Abszisse die Mittelwerte der Migrationshöfe aufgetragen. Jeweils unter den Kolumnen sind die Migrationsindizes für Fläche (A) und Durchmesser (B) aufgetragen, die als Quotient der jeweiligen Ergebnisse auf unbeschichteten, mit HSA (Humanserumalbumin) oder RGG (Rinder-Gammaglobulin) beschichteten Oberflächen berechnet wurden.

In Fig. 2 bezeichnet Kolumne I Polystyroloberfläche mit sechswertigem Chrom beschichtet, Kolumne II Polystyroloberfläche mit dreiwertigem Chrom beschichtet, Kolumne III Polystyroloberfläche mit sechswertigem Chrom unter Cystein-zusatz beschichtet und IV Polystyroloberfläche mit HSA und anschließend mit sechswertigem Chrom beschichtet. Die schwarzen Kreise stellen Ergebnisse von Patienten mit Chromatekzem, die weißen Kreise die Ergebnisse mit nicht sensibilisierten Kontrollpersonen dar.



3119269

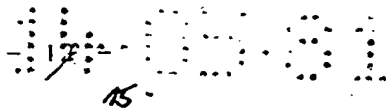
In Fig. 3 ist in stark vergrößerter Form ein Schnitt durch eine erfindungsgemäße Gelträgerplatte (1) mit einer darauf befindlichen Schicht (2), welche Antigen enthält, dargestellt. Die dargestellte Schicht (2) entspricht der Schicht von Beispiel 2, bei welcher niedermolekulares Hapten in der eigentlichen Proteinschicht verteilt vorliegt. Die Hapten-Moleküle sind dabei schematisch durch die Punktierung dargestellt.

Fig. 4 zeigt eine plattenförmige Unterlage (3), die einen erhöhten Rand (4) aufweist und 16 in vorgeformte Vertiefungen eingelegte Gelträgerplatten (1) enthält. Durch Übergießen mit einer Gelschicht und Einbringen der weißen Zellen in die Gelschicht eingestanzte Löcher oder in Form von Tröpfchen vor Aufbringung der Gelschicht kann dann das erfindungsgemäße Verfahren einfach durchgeführt werden, wobei entweder eine Mehrzahl von verschiedenen Antigenen für eine Untersuchungsperson oder eine Mehrzahl von Untersuchungspersonen für das selbe Antigen getestet werden können.

B e i s p i e l 1

Meerschweinchen wurden mit verschiedenen Proteinen nach einem Schema immunisiert, welches im wesentlichen zu zellulärer Sensibilisierung führt. Granulozytenreiches Peritonealexsudat dieser Tiere wurde verwendet und die daraus isolierten Zellen in Stanzlöcher von Agarose-schichten eingefüllt, die sich in Petrischalen befanden, an deren Boden verschiedene Proteine adsorptiv gebunden worden waren.

- a) Immunisierung der Versuchstiere
100 µg Human-Serum-Albumin (HSA) oder Rinder-Gamma-Globulin (RGG) wurden in isotonischem Phosphatpuffer 1 : 1 mit komplettem Freund'schen Adjuvans (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) vermischt und in 0,5 ml auf die Fußballen der Hinterpfoten und die



3119269

Nackenhaut von ca. 400 g schweren weiblichen Meerschweinchen verteilt. Nach 11 bis 14 Tagen ist die maximale Hautreaktion feststellbar.

b) Test der Hautreaktivität

20 µg Protein in 0,1 ml 0,15 M Kochsalzlösung wurden am äthernarkotisierten Tier intrakutan in das äußere Drittel eines Meerschweinchenohres appliziert und in gleicher Position am anderen Ohr 0,1 ml Kochsalzlösung als Kontrolle. Nach 24 h wurden am äthernarkotisierten Tier mit einer Lederlochzange aus den infiltrierten Bezirken Scheibchen von 4 mm Durchmesser entnommen und mit einer Feinwaage ausgewogen. Der Quotient zwischen Test- und Kontrollhautprobe wird als Korrelat der Hautreaktivität erfaßt.

c) Isolierung von Peritonealexsudatzellen nach Peptonstimulation

Meerschweinchen wurden intraperitoneal 10 ml 5 % pankreatisches Pepton (Kaseinat) injiziert und zur Gewinnung von granulozytenreichem Exsudat 24 h später die Bauchhöhle mit isotonischem Puffer unter Zusatz von 0,5 % EDTA gespült. Die Zellsuspensionen wurden gewaschen, gezählt und auf die Zellzahl von $2,5 \times 10^5/\mu\text{l}$ eingestellt.

d) Vorbehandlung der Migrationsflächen

Plastik-Petrischalen der Fa. Falcon Plastics (Polystyrol) Ø 6 cm wurden über Nacht mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) pH 7,4 inkubiert und anschließend mit 10 ml einer Lösung von jeweils 1mg/ml HSA oder RGG in PBS erneut 2 h bei 37 C inkubiert. Anschließend wurden die Proteinlösung entfernt und die Petrischalen jeweils dreimal mit 10 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung gespült.

13-05-81
16.

3119269

e) Herstellung der Agaroseplatten

0,8 g Agarose (Feinbiochemie, Kallies KG) wurden im Wasserbad in 45 ml Aqua dest. gelöst und auf 48 C abgekühlt. Sodann wurden 45 ml vorgewärmtes doppelt konzentriertes Zellkulturmedium hinzugefügt, dem zuvor 10 ml inaktiviertes Pferdeserum zugesetzt wurden. Bei dem Zellkulturmedium handelt es sich um minimal essentielles medium (MEM) nach Eagle, dem Antibiotika (60 U/ml Penicillin, 60 µg/ml Streptomycin) und 10 mM HEPES-Puffer zugesetzt wurden (pH eingestellt auf 7,2 bis 7,3). Die Agaroselösung wurde rasch auf die vorbereiteten Petrischalen verteilt und nach etwa 2 h wurden mit einer Teleskopkanüle Löcher von 2 mm Durchmesser ausgestanzt.

f) Testansatz

Mit einer Mikroliterspritze verbunden mit Dosiergerät wurden jeweils 4 µl der vorbereiteten Zellsuspensionen auf die Stanzlöcher der Petrischalen verteilt (4 bis 6 fache Parallelansätze pro Petrischale und jeweils 2 in gleicher Weise vorbehandelte Petrischalen) und 18 h bei 37 C inkubiert.

g) Auswertung

Zunächst wurden die Migrationshöfe durch jeweils 30 min Inkubation mit mind. 70 % Alkohol oder Methanol und 30 % Formalin fixiert, die Agaroseschicht abgehoben und die Migrationshof-Durchmesser bestimmt. Dann wurden Migrationsindizes (MI) errechnet, die dem Quotienten aus Durchmesser bzw. errechneter Fläche mit und ohne vorheriger Proteinbeschichtung entsprechen:

$$\frac{\text{mittl. Migrationsfläche (Durchm.) mit Protein}}{\text{mittl. Migrationsfläche (Durchm.) ohne Protein}} = \text{MI}$$

Die Migrationshöfe wurden in einem umgebauten Lesegerät für Mikrofilme ausgemessen und mit Hilfe eines Rechnerprogrammes Standardabweichungen und Variationskoeffizienten berechnet.

11.05.61

3119269

17.

Interpretation der Resultate

Am 14. Tag nach der Immunisierung wurden die Meerschweinchen getötet, nachdem zuvor ihre Sensibilisierung im Hauttest geprüft worden war. Durch Peptoninjektion war ein Peritonealexsudat erzeugt worden, dessen Zellen 24 h nach der Injektion zu 20 % aus mononukleären Zellen und zu 80 % aus polymorphkernigen Granulozyten bestehen, so daß ein günstiges Verhältnis zwischen sensibilisierten Lymphozyten und Indikatorzellen vorliegt.

Fig. 1 der beigefügten Zeichnung zeigt in Form von Säulendiagrammen die absoluten Flächen der Migrationshöfe in Petrischalen ohne Proteinbeschichtung (Kontrollen), mit HSA und RGG jeweils für Zellsuspensionen von Kontrolltieren und von immunisierten Tieren. Darunter sind für die Flächen bzw. für die Durchmesser die jeweiligen Migrationsindizes angegeben (in % der Kontrolle, d. h. MI . 100). Es ist ersichtlich, daß nur auf denjenigen Oberflächen die Migration gehemmt war, die mit dem zur Immunisierung der jeweiligen Tiergruppe verwendeten Proteinantigen beschichtet waren. Wie allgemein üblich, wurde als Entscheidungsschwelle für gehemmte Migration ein MI von 0,80 (80) oder darunter verlangt, wenn mit Migrationsflächen gerechnet wurde (MI_A). Auf Grund der Signifikanzberechnungen wären allerdings noch höhere Schwellenwerte zulässig gewesen. Lediglich das dritte mit RGG immunisierte Tier (gestrichelte Kolumne in der Abbildung) wies keine signifikante Hemmung auf. Im Vergleich mit den Ergebnissen des Hauttests zeigte sich, daß dieses Tier nicht hinreichend sensibilisiert war. Das Ausmaß der Migrationshemmungen entspricht den Ergebnissen mit herkömmlichen Verfahren ebenso wie die erzielte Aussage.

Beispiel 2

Als Beispiel einer humanmedizinisch relevanten Typ IV - Überempfindlichkeit wurden Patienten mit gesichertem

14.05.81
18.

3119269

Chromatekzem, zumeist Bauarbeiter die häufig mit chromathaltigem Zement in Kontakt kommen, und zum Vergleich nicht sensibilisierte gesunde Spender herangezogen. Hauttests wurden in üblicher Weise intrakutan durchgeführt, um den Sensibilisierungszustand der Patienten zu bestätigen.

Im Test wurden Leukozyten aus dem peripheren Blut dieser Probanden eingesetzt. Sie wurden auf Plastik-Petrischalen getestet, die zuvor mit Chromverbindungen beschichtet worden waren.

a) Vorbehandlung der Migrationsflächen

Verfahren wurde, wie unter Beispiel 1 d) beschrieben, durchgeführt. Statt Proteinlösungen wurden Lösungen von 1 mg/ml CrCl_3 bzw. $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ in PBS zur Inkubation verwendet (entspricht dreiwertigem bzw. sechswertigem Chrom). Um Adsorption und vor allem die Konversion zu dreiwertigem Chrom zu begünstigen, wurde in einigen Petrischalen Cystein zugesetzt. In weiteren drei Petrischalen wurde zunächst, wie unter 1 d) beschrieben, mit HSA und anschließend mit $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ inkubiert und anschließend dreimal gespült.

b) Herstellung der Agaroseplatten

Verfahren wurde, wie unter Beispiel 1 e) beschrieben, durchgeführt.

c) Testansatz

Peripheres Venenblut der Probanden wurde mit Heparin (50 U/ml) und einem Sedimentationsbeschleuniger versetzt (auf 16 ml Blut 4 ml Infukoll-6 %, Serumwerk Bernburg) und 1 h bei 37 C inkubiert. Der leukozytenhaltige Überstand wurde abgehoben und mit Hank's Lösung gewaschen (10 min 350 g_{max} , zweimal je 8 min 260 g_{max}). Zur Beseitigung von Erythrozytenkontaminationen wurde eine hypotone Lyse mit Aqua dest.

zwischengeschaltet (30 sec., 4C). Die Zellen wurden gezählt und auf eine Packungsdichte von $2,5 \cdot 10^5$ weiße Zellen/ μ l eingestellt. In jeweils 4 Parallelansätzen wurden 4 μ l in die Stanzlöcher der Agaroseschichten eingefüllt. Es folgte eine Inkubation von 18 h bei 37 C.

d) Auswertung

Verfahren wurde, wie unter Beispiel 1 g) beschrieben, durchgeführt.

Interpretation der Resultate

Das Chromatekzem zählt zu den wichtigsten Berufsdermatosen. Testet man auf herkömmliche Weise die Sensibilisierung gegenüber Chromverbindungen, so wird der Patient epikutan oder intrakutan exponiert. Dies sollte vermieden werden. Außerdem sollte die Sensibilisierung exakter erfaßt werden, als dies in einem Hauttest möglich ist. Prophylaktisch wäre ein expositionsfreies screening von Risikogruppen wünschenswert. Hauptsächlich wurde dieses Krankheitsbild jedoch ausgewählt, um mit einer unproblematischen eindeutig chemisch charakterisierten Verbindung die Funktionsfähigkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens (solid-phase LMTA) nachzuweisen. Dabei sind CrCl_3 und $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ als Haptene zu betrachten, die erst nach Bindung an Plasmaproteine (durch Konzentration und Vernetzung der Determinanten) als Antigen wirksam werden können.

Wie aus Fig. 2 ersichtlich ist (die ersten drei Spalten), führten adsorbierte Chromverbindungen nicht zu differenzierenden Ergebnissen zwischen gesunden Probanden und Chromatekzematischer, obwohl die höchste Beladungsdichte der Ansätze in Fig. 2 bei No. III (Zusatz von Cystein) festgestellt wurde (mit Hilfe der Atomabsorptionspektrophotometrie). Leukozyten beider Gruppen waren etwa in gleichem Maße gehemmt.

- 27. 05. 81

3119269

Nach Doppelbeschichtung mit Human-Serumalbumin (HSA) und einer Chromverbindung wurden jedoch die Leukozyten der Chromatekzematischer im Gegensatz zu den Vergleichspersonen stärker gehemmt.

Das Beispiel zeigt, daß im erfindungsgemäßen solid-phase LMTA auch zellvermittelte Sensibilisierung gegenüber Haptenen feststellbar ist und daß dieser Test für menschliche Leukozyten und klinisch-diagnostische Fragestellungen angewendet werden kann.

29.
Leerseite

01.07.83
M.

2

3119269

NACHSCHUFT

FIG. 3

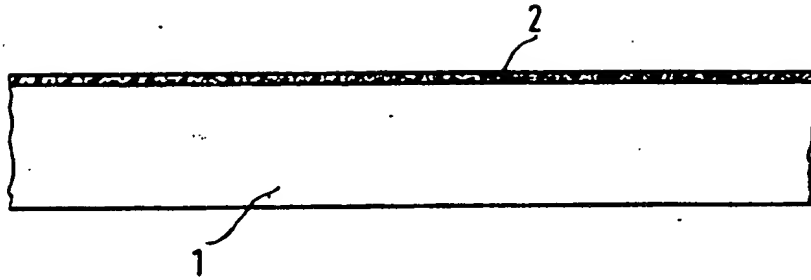
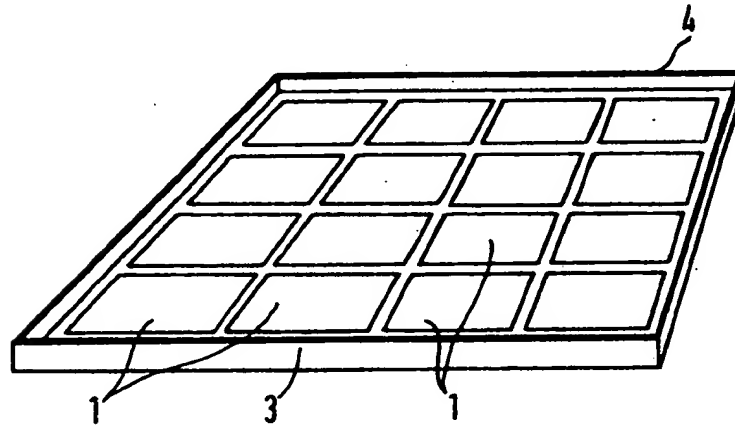


FIG. 4



NACHGEPRÜFT

010700
- 23 -

07. Juli 1982 1/2

Nummer: 3119269
Int. Cl. 3: C12Q 1/00
Anm. Idet. tag: 14. Mai 1981
Offenlegungstag: 2. Dezember 1982

FIG. 2

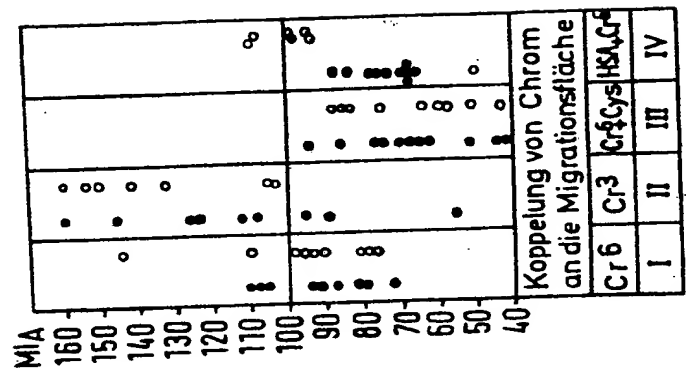


FIG. 1

